

用 ITS 序列确定小麦 B 基因组的 可能供体间的关系*

张文驹² 瞿礼嘉² 高巍² 顾红雅**² 陈章良³ 陈家宽¹

¹(武汉大学生命科学院 武汉 430072)

²(北京大学蛋白质工程和植物基因工程国家重点实验室 北京 100871)

³(复旦大学生物多样性科学研究所 上海 200433)

The phylogenetic relationships among the possible donors of B-genome of common wheat based on internal transcribed spacer(ITS) sequences

¹ZHANG Wen-Ju ²QU Li-Jia ²GAO Wei ²GU Hong-Ya

²CHEN Zhang-Liang ³CHEN Jia-Kuan

¹(College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072)

²(The National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, Peking University, Beijing 100871)

³(Institute of Biodiversity Science, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract The ITS regions of 5 species in *Aegilops* sect. *Sitopsis*, the possible donors of B-genome of common wheat, were amplified by PCR, cloned and sequenced. The phylogenetic relationships among 5 species in *Aegilops* sect. *Sitopsis* were constructed based on ITS1 + ITS2 sequences. The results demonstrated that *Ae. speltoides* was a distinct species in *Aegilops* sect. *Sitopsis*. The average of the pairwise distances between *Ae. speltoides* and the other four species was three times as high as that among the latter four. *Ae. speltoides* was the earliest lineage of the section under question. Relationship between *Ae. longissima* and *Ae. sharonensis* was the closest in *Aegilops* sect. *Sitopsis*. Sequence of ITS region could be used as a molecular marker to identify origin of B-genome in polyploid wheats.

Key words Wheat; *Aegilops* sect. *Sitopsis*; ITS sequence; Phylogeny; B-genome

摘要 对小麦 B 基因组的可能供体山羊草属 *Aegilops* sect. *Sitopsis* 的 5 个种的核糖体 DNA 的内部转录区(ITS)进行了 PCR 扩增和克隆,并测定 ITS1 和 ITS2 的序列,用 ITS1 + ITS2 的序列重建了 *Aegilops* sect. *Sitopsis* 中 5 个种的系统发育关系。结果表明,斯卑尔脱山羊草 *Ae. speltoides* 是 sect. *Sitopsis* 中特殊的一个种,它与该组其余 4 种间的平均遗传距离是后者彼此间平均遗传距离的 3 倍,*Ae. speltoides* 与同组其余 4 个种的分离要比后者相互间的分离早得多;在拟斯卑尔脱组 sect. *Sitopsis* 的 5 个种中,长柱山羊草 *Ae. longissima* 与沙融山羊草 *Ae. sharonensis* 的关系最近。ITS 序列可以进一步用来作为确定 B 基因组起源的分子标记。

关键词 小麦;山羊草属拟斯卑尔脱组;ITS 序列;系统发育;B 基因组

普通小麦(*Triticum aestivum* AABBDD)的 B 基因组的起源是近百年来一直有争议

* 北京大学蛋白质工程和植物基因工程国家重点实验室和国家自然科学基金(39770056)资助。

** 通讯联系人

1998-11-12 收稿,1999-04-08 收修改稿。

的问题,山羊草属 *Aegilops* 的 sect. *Sitopsis* 中的每一个种都被认为是 B 基因组可能的供体(Kerby & Kuspura, 1987), 该组植物包括 *Ae. longissima*、*Ae. sharonensis*、*Ae. bicornis*、*Ae. searsii* 和 *Ae. speltoides* 5 个种;有学者还提出 B 基因组并非只来自一个种,而是来自 sect. *Sitopsis* 的几个种(Sarkar & Stebbins, 1956)。因此,要确定 B 基因组的起源,首先就必须研究清楚 sect. *Sitopsis* 的种间关系。一些学者应用形态学、细胞学、RFLP 和 DNA 序列等方法对该组植物进行了研究(Badaeva *et al.*, 1996; Sasanuma *et al.*, 1996; Talbert *et al.*, 1995; Dvorák & Zhang, 1992; Eig, 1929),但不同方法得到的结论并不完全一致,而且仅根据外部形态特征和 RFLP 标记,有时难以确定 B 基因组与可能的二倍体供体之间的相互关系(Sasanuma *et al.*, 1996),这需要另找更好的特征。在许多类群中,人们已证明核糖体 DNA 的 ITS (internal transcribed spacer) 序列是一个用来区别低级分类群的良好分子标记(molecular marker)(Baldwin *et al.*, 1995)。本文对 sect. *Sitopsis* 5 个种的 ITS 区进行了 PCR 扩增,克隆并测定他们各自的 ITS1 和 ITS2 的序列,然后应用 ITS1 + ITS2 的序列分析了 sect. *Sitopsis* 内种间的系统发育关系。

1 材料和方法

1.1 材料来源

实验材料见表 1, 其中 *Ae. longissima* (Y152) 和 *Ae. speltoides* 的 Ae48 来自以色列, *Ae. searsii* (KU5-1) 来自叙利亚, *Ae. sharonensis* 的分布仅局限于巴勒斯坦地区的沙融平原,其余材料的原产地缺乏详细记录。

表 1 实验材料的名称、缩写、基因组类型以及来源
Table 1 The name, abbreviation, genome and source of materials

Taxa	Abbreviation	Genome	Source and accession No.
<i>Taeniatherum caput-medusae</i> (L.) Nevski	TAC	TT	Hsiao <i>et al.</i> 1995 ¹⁾
<i>Aegilops. bicornis</i> (Forsk.) Jaub.	BIC	S ^b S ^b	ICGR, Ae 4
<i>Ae. longissima</i> Schweinf. and Muhl.	LON	S ^l S ^l	ICGR ²⁾ , Y152
<i>Ae. searsii</i> Feld. and Kis. ex Hammer	SEA	S ^s S ^s	Kawahara, KU4-7
<i>Ae. sharonensis</i> Eig.	SHA- I	S ^{sh} S ^{sh}	Liu Deng-Cai, no number
	SHA- II	S ^{sh} S ^{sh}	Kawahara, KU5-1
<i>Ae. speltoides</i> Tausch	SPE- I	SS	ICGR, Ae 48
	SPE- II	SS	ICGR, Ae 29

注: 1) *Taeniatherum caput-medusae* 的 ITS 序列来自 Hsiao *et al.* 1995

2)ICGR 代表中国农科院品质资源所

Note: 1)The ITS sequence of *Taeniatherum caput-medusae* was taken from Hsiao *et al.* 1995

2)ICGR is the abbreviation for Institute of Crop Germplasm Resource, Chinese Academy of Agricultural Science.

图 1 *Aegilops* sect. *Sitopsis* 和外类群的 ITS1 和 ITS2 的序列。序列的名称为种加词的开头三个字母(见表 1), 后面的数字为克隆编号;TAC 为外类群, 序列来自 Hsiao *et al.* (1995);
“(圆点)”代表与第一列序列相同的位点, “?”(问号)为未确定的位点。

Fig.1 Aligned ITS1 and ITS2 sequences of 5 species in *Aegilops* sect. *Sitopsis* and the outgroup. Arabic number following the abbreviation of species is cloned number; TAC is outgroup, *Taeniatherum caput-medusae*, and its ITS sequence was from Hsiao *et al.* (1995); dots indicate sites identical with those in the sequence of the outgroup; question marks indicate missing data.

→ ITS1

TAC TCGTGACCCT GACCAAAACA GACCGGCAC GCGTCATCAA ATCGTCGGC GACGGCACG ACCGTCGCTC GGCAATGCC TCGACCACT CCCTCTCTCG

SPE-I4 T...C.....T...T.....

SPE-II2 .?.....C.....T.....

SHA-I3 T...C...A...T...T...T...A.....?

SHA-II2 C...T...T...T...A...?..A.....

BIC 5 C...T...T...T.....

LON 2 .T.....C.....T...T...T.....

SEA 1?..C.....T...T.....

TAC GACTGGGTGG GGGCTGAGG CAAAAGAACC CACGGGCCG AAGCGCTCAA GGAACACTGT GCCTAACCG TGGGCATGCC TAGCTTGCTA GCGTCCCAT

SPE-I4 ...C.....T...GT..T.....G.....TC

SPE-II2 ...C.....T...T.G.T.T.....G.....TC

SHA-I3 ...C.....G..T.....?.....G.....TC

SHA-II2 ...C.....G..T.....G.....TC

BIC 5 ...C..T.....G..T.....G.....TC

LON 2 ...C.....G..T.....G.....TC

SEA 1 ...C.....G..T.....G.....TC

→ ITS2

TAC GTGTGCAAA GCTATTTAAT C CAAAACAGC TCCCAACAC CCTCATCGG AATCGGGATG CGGCATCTG TCCCTGCTCT CACAAGGGGC

SPE-I4 TA.....

SPE-II2 A.....A.....G.....

SHA-I3 A.....A.....G.....A

SHA-II2 A.....A.....G.....T

BIC 5 G.....

LON 2 G.....A

SEA 1 T.....G.....

TAC GGTGGACCGA AGATCGGGCT GCGGGGTAC CGGCGCGAC ACAGCGCATG GTGGCGTCC TCGCTTTATC AACGCAGTGC ATCGAGCGG CAGCCGGCAT

SPE-I4 T.....T.....T.....

SPE-II2 T.....T.....T.....

SHA-I3 T.....

SHA-II2 T.....

BIC 5 T.....

LON 2 T.....

SEA 1 T.....T.....

TAC GATGGCCTCA AAACGACCCA GCAAACGAAG CGCAGTGGC TTGACG

SPE-I4 T.....T.....A.....

SPE-II2 T.....T.....A.....

SHA-I3 T.....G.....T.....

SHA-II2 T.....G.....T.....

BIC 5 A.....G..T.....T.....

LON 2 T.....G.....T.....

SEA 1 T.....G.....T...T.....

1.2 实验方法

用 CTAB 法提取总 DNA; 扩增 ITS 区的引物参照 White *et al.* (1990), 序列如下: “ITS5” 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' 和 “ITS4” 5'-TCCTCCGCT-TATTGATATTCGC-3'; PCR 反应条件, ITS 片段的克隆以及序列的测定见张文驹等 (1998)。由于 ITS1 和 ITS2 区之间的 5.8S rDNA 十分保守, 本实验对其不予考虑, 只测定了位于 ITS 区两端的 ITS1 和 ITS2 的序列。

1.3 DNA 序列的分析

DNA 序列的排序用 CLUSTAL V 完成 (Higgins *et al.*, 1992); 邻接树 (neighbor-joining tree) 根据 Kimura-2 参数遗传距离 (Kimura-2 parameter genetic distance) 用 MEGA 计算 (Kumar *et al.*, 1993; Saitou & Nei, 1987; Kimura, 1981); 最大简约树 (maximum parsimony tree) 根据 PAUP 3.1.1 中的 Branch-band 法 (Swofford, 1993) 和 PHYLIP 中的 DNAPARS (Felsenstein, 1995) 计算, 最大似然树 (maximum likelihood tree) 根据 HKY 分子替代模型用 PUZZLE 4.0 计算 (Strimmer & Haeseler, 1997; Hasegawa *et al.*, 1985)。在分支分析中, *Taeniatherum caput-medusae* (L.) Nevski 与 *Triticum* 和 *Aegilops* 关系十分密切 (Hsiao *et al.*, 1995), 选该种为外类群; 小麦属 *Triticum*、黑麦属 *Secale* 与 *Aegilops* 的关系也较近 (Hsiao *et al.*, 1995), 分别选它们为外类群进行计算并比较。由于 *Aegilops* sect. *Sitopsis* 各种间的 ITS1 和 ITS2 的变异都较小, 因此分支分析时把 ITS1 和 ITS2 结合在一起计算。

2 结果和讨论

2.1 ITS1 和 ITS2 的长度和变异

PCR 扩增 ITS 区的产物为一条长约 700 bp 的带, 克隆后测定了 ITS1 和 ITS2 的序列, 结果见图 1。ITS1 长为 221 bp, 变异位点 23 个, 占全长的 10.4%; ITS2 长为 217 bp, 变异位点 18 个, 占全长的 8.3%。根据 Kimura-2 参数遗传距离模型计算得到的序列间的遗传距离 ($\times 100$) 见表 2, ITS1 和 ITS2 的距离变化范围都为 0.46~5.79, 平均值分别为 2.87 和 3.40, ITS2 的平均值大于 ITS1 的平均值, 这与大多数被子植物不同。在多数被子植物类群中, ITS1 的变异大于 ITS2 的变异 (Baldwin *et al.*, 1995), 但外类群与 sect. *Aegilops* 之间 ITS1 的变异大于 ITS2 的变异, 另外在 *Ae. speltoides* 的两个个体间和 *Ae. sharonensis* 的两个个体间的 ITS1 的变异也大于 ITS2 的变异。我们不知道为什么在不同等级的类群中 ITS1 和 ITS2 的变异会有如此的变化。这一结果表明单独用 ITS1 或 ITS2 作为分子标记 (molecular marker) 来重建这些种的系统发育关系可能会导致错误的结论。另一个有意义的结果是同一种内不同的个体间存在变异, 来自以色列的 *Ae. speltoides* (编号为 Ae48) 与同种的另一份材料 (原产地不详, 编号为 Ae29) 的两个个体间 ITS1 和 ITS2 的距离分别为 2.35 和 1.87; 另外, Chatterton *et al.* (1992) 曾报道过该种的 ITS 序列, 它与我们得到的结果差异则更大, 本文作者已分析过该序列可能存在的问题 (张文驹等, 1998), 这里不再重复; 来自 *Ae. sharonensis* 两份材料的两个个体间的 ITS1 和 ITS2 的距离分别为 1.88 和 0.46, 小于 *Ae. speltoides* 的两个个体间的距离。从表 2 中可以看出, 在 sect. *Sitopsis* 中, *Ae. speltoides* 的 ITS1 和 ITS2 与同组其余 4 个种

相应片段的序列差异较大, 它的平均遗传距离分别为 2.83 和 5.28, 而 *Ae. searsii*、*Ae. bicornis*、*Ae. longissima* 和 *Ae. sharonensis* 4 个种之间 ITS1 和 ITS2 的差异则很小, 其平均遗传距离分别为 0.93 和 1.76, 只有前两个值的 1/3, 后两个值甚至比 *Ae. speltoides* 种内个体间的距离还小。上述事实表明 *Ae. speltoides* 是 sect. *Sitopsis* 中特殊的一个种, 与同组其余的种有较大差异。由于 *Ae. speltoides* 与同组的其余 4 个种的生活史、生境等都较相似, 我们没有特殊的理由推断在 sect. *Sitopsis* 的 5 个种 ITS 序列的碱基替代速率会发生大的变化, 因此, 对上述事实的一种解释是: *Ae. speltoides* 与其余 4 个种的分化时间不同, *Ae. speltoides* 的分化要比同组的其余 4 个种间的分化早。这一推断与形态特征很一致, *Ae. speltoides* 与其余 4 个种差异明显, 而后 4 个种彼此间差异很小, 特别是 *Ae. longissima*、*Ae. sharonensis* 和 *Ae. searsii* 之间很难区别。这一结果与 Sasanuma *et al.* (1996) 根据 RFLP 的研究得到的结论不同, 后者认为 *Ae. speltoides* 和 sect. *Sitopsis* 的其他种几乎是同时产生的。另一种可能性是 *Ae. speltoides* 的 ITS 重复序列存在差异较大的拷贝, 对这一问题, 我们将在下文讨论。

表 2 基于 Kimura-2 参数遗传距离模型的 *Sitopsis* 组的 5 个种和外类群的 ITS1(右上部)和 ITS2(左下部)序列间的遗传距离($\times 100$)。

Table 2 The genetic distances of ITS1 and ITS2 sequences of 5 species in sect. *Sitopsis* and the outgroup based on Kimura-2 model

	TAC	SPE- I 4	SPE- II 2	SHA- I 3	SHA- II 2	BIC5	LON2	SEA1
TAC		5.77	5.28	5.78	5.79	5.28	4.79	4.29
SPE- I 4	3.78		2.35	3.80	3.80	3.31	2.83	2.35
SPE- II 2	4.77	1.87		3.31	3.32	2.83	2.35	1.88
SHA- I 3	3.31	5.27	5.27		1.88	1.40	0.93	1.40
SHA- II 2	3.30	5.26	5.26	0.46		1.40	0.93	1.40
BIC 5	2.84	5.27	5.27	1.87	1.87		0.46	0.93
LON 2	2.83	4.78	4.78	0.46	0.93	1.40		0.47
SEA1	3.81	5.79	5.79	2.35	2.34	2.35	1.88	

2.2 分支分析

根据 ITS1 + ITS2 序列重建的邻接树(NJ)、简约树(MP)和最大似然树(ML)(图 2, 图 3, 图 4), 三者拥有完全相同的拓扑结构。从图中可看到来自 sect. *Sitopsis* 的 7 个序列形成两个高度稳定的分支, 一个分支由 *Ae. speltoides* 的两个个体的序列构成, 支持率为 97%, 另一个分支由 *Ae. searsii*、*Ae. bicornis*、*Ae. longissima* 和 *Ae. sharonensis* 4 个种的序列构成, 支持率等于或大于 97%。在后一个分支中, *Ae. searsii* 最先分出, 其次是 *Ae. bicornis*, 最后分开的是 *Ae. longissima* 和 *Ae. sharonensis*, 但简约树和邻接树中重抽样检测(Bootstrap)的支持率都不是太高, *Ae. sharonensis* 的两个个体的序列构成一个小的分支, 在简约树和邻接树中重抽样检测(Bootstrap)的支持率都不到 70%。这些分析结果表明可以把 sect. *Sitopsis* 分为两类, 一类只有 *Ae. speltoides* 一个种, 另一类包括 sect. *Sitopsis* 的其余 4 个种, 而从邻接树中可以看出这 4 个种彼此间差异很小, 其中以 *Ae. longissima* 和 *Ae. sharonensis* 的关系最近。我们还分别选择了与 *Aegilops* 关系较近的 *Triticum urartu* (张文驹等, 1998)、*Secale cereale* (Hsiao *et al.*, 1995) 和 *Lophopyrum*

elongatum (Hsiao *et al.*, 1995) 作为外类群, 用上述三种方法进行计算, 得到的分支树与上述结果一致, 各分支的支持率也相似(数据未出示)。

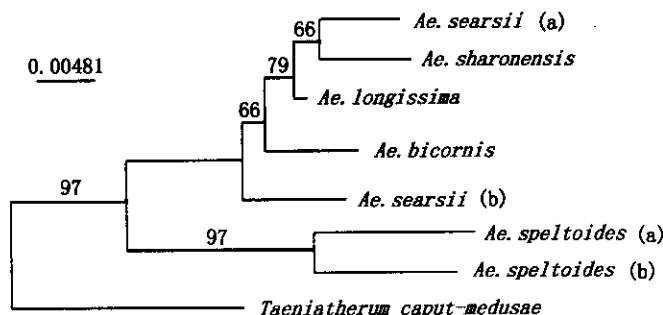


图2 邻接树。根据 ITS1 + ITS2 序列用 MEGA 完成。*Taeniatherum caput-medusae* 为外类群, 序列间的距离根据 Kimura-2 参数遗传距离模型计算, 缺少和不确定的位点在计算中被省略, 分支上面的数字是 500 次重复抽样检测的 bootstrap 值。

Fig. 2 The neighbor-joining tree derived from MEGA (Kumar *et al.*, 1993) based on ITS1 + ITS2 sequences using Kimura-2 parameter model. Gaps and missing data were eliminated. *Taeniatherum caput-medusae* is outgroup; numbers are bootstrap values (%) of 500 replications.

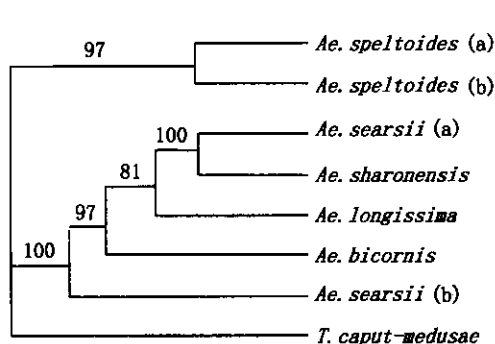


图3 最大简约树。根据 ITS1 + ITS2 序列用 PAUP3.1.1 (Swofford, 1993) 中的 Branch-bound 方法, 得到的唯一最大简约树。*T. caput-medusae* 为外类群, 分支上面的数字代表 500 次重复抽样检测的 bootstrap 值。

树长 = 45 步; 一致性系数 (CI) = 0.978

Fig. 3 Only one parsimonious tree generated from PAUP 3.1.1 based on ITS1 + ITS2 sequences using Branch-bound method. *Taeniatherum caput-medusae* is outgroup; numbers on the branches are bootstrap values (%) of 500 replications. Tree length = 45 steps; CI = 0.978.

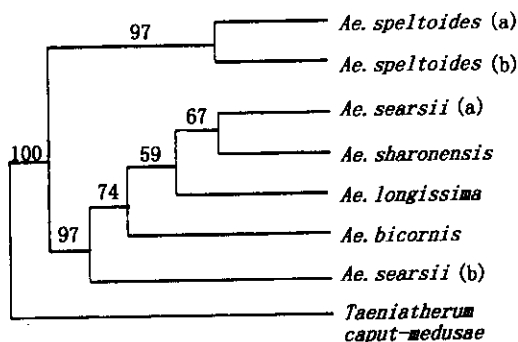


图4 最大似然树。根据 ITS1 + ITS2 序列和 HKY 替代模型 (Hasegawa *et al.*, 1985) 用 PUZZLE 4.0 (Strimmer & Haeseler, 1997) 计算。*T. caput-medusae* 为外类群, 分支上面的数字是 1000 次 quartet puzzling 分析所得的百分比。

Fig. 4 The maximum likelihood tree based on ITS1 + ITS2 sequences employing PUZZLE 4.0 (Strimmer & Haeseler, 1997) using HKY model (Hasegawa *et al.*, 1985). *Taeniatherum caput-medusae* is outgroup; numbers are percent of 1000 quartet puzzling searches.

由于 ITS 区是多拷贝的重复序列, 我们测到的序列只是众多拷贝中的一个, 上述“基因树”能否反映该组植物的系统发育关系或者说等同于“系统树”有待进一步讨论。“基因树”等同于“系统树”的前提是: ①所选定的序列真正同源, ②在世系之内序列的替代速率一致或者相互间差异很小, ③替代的速率要在一定的范围之内。要在每一个研究类群中都证明前两点很困难。就 ITS 序列来说, 虽然在少数类群的个体内确实存在不同的拷贝, 特别是在多倍体中 (Ainouche & Bayer, 1997; Suh *et al.*, 1993), 但就大多数被子植物来说, ITS 序列的同步进化 (concerted evolution) 十分明显, ITS 序列的众多拷贝已变得高度相似或一致化 (Baldwin *et al.*, 1995), 这一结果在一定程度上克服了非同源的障碍。另外, 除了部分生活史有很大差别的类群间 ITS 序列的替代速率有较大差异外, 在许多类群内 ITS 序列的替代速率是基本稳定的 (Baldwin *et al.*, 1995)。在禾本科众多的二倍体植物中 ITS 区的同步进化较明显 (Hsiao *et al.*, 1995), 另外, sect. *Sitopsis* 的几个种生活史较相似, 没有特别的理由推断在这 5 个种中 ITS 序列的变异会发生较大变化, 因而上述基因树在一定程度上能反映相互间的系统发育关系。然而, 从上述邻接树和简约树可以看出, *Ae. searsii*、*Ae. bicornis*、*Ae. longissima* 和 *Ae. sharonensis* 的 ITS 序列间的关系的支持率虽然都大于 50%, 但都小于 80%, 这是由于这 4 个种间 ITS 序列的差异较小造成的。而在最大似然树中每一个分支都得到较高的支持, 但由于最大似然树上的支持率与 Bootstrap 值不同, 因而难以比较。上述结果与根据形态学特征、重复序列的 RFLP 等方面的研究得出的结论一致。Eig (1929) 根据形态特征的研究把 sect. *Sitopsis* 分成两个亚组: subsect. *Truncata* 和 subsect. *Emarfinata*, 前者只有 *Ae. speltoides* 一个种, 后者包括其余 4 个种, 后 4 个种形态上彼此差异很小, 其中, *Ae. sharonensis* 与 *Ae. longissima* 最为接近, 曾被一些学者看成是同一个种 (Chennaveeraiah, 1961); Dvorák 和 Zhang (1992) 根据部分重复序列长度变异的研究得出的分支树与上述分支树完全一致; Sasanuma (1996) 等根据 RFLP 的研究用 UPGM 法计算得到的聚类图与本实验得到的结果十分相似, 其中 *Ae. searsii*、*Ae. bicornis*、*Ae. longissima* 和 *Ae. sharonensis* 间的关系与上述图 2、3、4 中的完全一致, *Ae. speltoides* 与这 4 个种的遗传距离也较大。值得注意的是 ITS 序列不仅能区分 sect. *Sitopsis* 的几个种, 而且由于多倍体小麦的 18S-26S nrDNA 的主位点 (major locus) 在 1B 和 6B 上 (Mukai *et al.*, 1996), A 基因组上的 18S-26S nrDNA 已散失或者变得很少, 使我们就有可能从多倍体小麦中克隆出 B 基因组的 ITS 片段, 研究这些片段的进化式样, 并通过对这些片段与 sect. *Sitopsis* 的 ITS 片段比较, 寻找出 B 基因组的真正供体, 特别是可以判断是来自 *Ae. speltoides* 还是来自同组的其他种。

致谢 中国农业科学院陈新明和李立会先生, 四川小麦研究所刘登才, 日本京都大学的 Kawahara 博士提供部分实验材料, 北京大学王艇和胡蕺参加部分实验, 特此致谢。

参 考 文 献

- 张文驹, 瞿礼嘉, 高巍, 顾红雅, 陈家宽, 陈章良, 1998. 普通小麦最可能的四个二倍体供体的 ITS1 和 ITS2 序列及其亲缘关系. 植物学报, 40(11): 994~1000
- Ainouche M L, Bayer R, 1997. On the origins of the tetraploid *Bromus* species (section *Bromus*, Poaceae): insights from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. Genome, 40: 730~743

- Badaeva E D, Friebe B, Gill B S, 1996. Genome differentiation in *Aegilops* 2. Physical mapping of 5S and 18S-26S ribosomal RNA gene families in diploid species. *Genome*, 39: 1150~1158
- Baldwin G B, Sanderson M J, Porter J M, Wojciechowski M F, Campbell C S, Donoghue M J, 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann Missouri Bot Gard*, 82: 247~277
- Chennaveeraiah M S, 1960. Karyomorphie and cytotaxnomic studies in *Aegilops*. *Acta Horti Gotoburgensis*, 3: 85~178
- Dvorák J, Zhang H B, 1992. Reconstruction of the phylogeny of the genus *Triticum* from variation in repeated nucleotide sequences. *Theor Appl Genet*, 84: 419~429
- Eig A, 1929. Monographisch-kritische Übersicht der Gattung *Aegilops*. *Feddes Repert*, 55: 24~28
- Felsenstein J, 1995. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.57c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA
- Hasegawa M, Kishino H, Yano K, 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol*, 22: 160~174
- Higgins D G, Bleasby A J, Fuchs R, 1992. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *CABIOS*, 8:189~191
- Hsiao C, Chatterton N J, Asay K H, Jenson K B, 1995. Phylogenetic relationships of the monogenic species of the wheat tribe Triticeae (Poaceae) inferred from nuclear rDNA (ITS) sequences. *Genome*, 38:211~223
- Kerby K, Kuspura J, 1987. The phylogeny of polyploid wheats *Triticum aestivum* (bread wheat) and *Triticum turgidum* (macaroni wheat). *Genome*, 29: 722~737
- Kimura M, 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequence. *J Mol Evol*, 16: 111~120
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 1993. MEGA: molecular evolutionary genetic analysis, version 1.01. Institute of Molecular Evolutionary Genetics, Pennsylvania State University, University Park PA, 16802, USA
- Mcgrrey P, Kaper J M, 1991. A simple and rapid method for screening transgenic plant using PCR. *Biotechniques*, 11: 428~432
- Mukai Y, Endo T R, Gill B S, 1991. Physical mapping of the 18S-26S rRNA multigene family in common wheat: identification of a new locus. *Chromosoma*, 100: 71~78
- Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4: 1406~1425
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning* 2nd ed. Cold Spring Harbor. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sarkar P, Stebbins G L, 1956. Morphological evidence concerning the origin of the B genome in wheat. *Am J Bot*, 43: 297~304
- Sasanuma T, Miyashita N T, Tsunewaki K, 1996. Wheat phylogeny determined by RFLP analysis of nuclear DNA: 3. Intra- and interspecific variation of five *Aegilops* sect. *Sitopsis* species. *Theor Appl Genet*, 92: 928~934
- Strimmer K, Haeseler A, 1997. PUZZLE (Maximum likelihood analysis for nucleotide, amino acid, and two-state data) Version 4.0. M N Zoologisches Institut, Universität München, München, Germany
- Suh Y, Thien L B, Reeve H E, Zimmer E A, 1993. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. *Am J Bot*, 80:1042~1055
- Swofford D L, 1993. PAUP 3.1.1: phylogenetic analysis using parsimony. For Apple Macintosh. Champaign, Illinois: Illinois Natural History Survey
- Talbert L E, Blake N K, Storlie E W, Lavin M, 1995. Variability in wheat based on low-copy DNA sequence comparisons. *Genome*, 38: 951~957
- White T J, Brunns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Edited by Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J. San diego:Academic Press. 315~322